

Variasi Genetik *Rice Tungro Bacilliform Virus* (RTBV) dari Daerah Istimewa Yogyakarta, Nusa Tenggara Barat, dan Sulawesi Tengah

(Genetic Variation of *Rice Tungro Bacilliform Virus* [RTBV] from Yogyakarta, West Nusa Tenggara, and Central Sulawesi)

R. Heru Praptana¹, Y.B. Sumardiyono², Sedyo Hartono², dan Y. Andi Trisyono²

¹Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Jl. Merdeka No. 147, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8334089, 8331718; Faks. (0251) 8312755; E-mail: herujuly@yahoo.com

²Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora, Bulaksumur, Yogyakarta 55281 Indonesia
Telp. (0274) 563062; Faks. (0274) 563062

Diajukan: 27 April 2017; Direvisi: 3 Juli 2017; Diterima: 6 September 2017

ABSTRACT

Tungro is one of the major diseases of rice which has become a constraint in increasing rice production in Indonesia. Tungro is caused by infection of two serologically-unrelated viruses, i.e. *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) and *Rice tungro spherical virus* (RTSV), both of which can only be transmitted by green leafhoppers, especially *Nephotettix virescens* (Distant), in a semipersistent manner. Information on genetic diversity of tungro virus is needed for management of the disease using resistant varieties. This research aimed to study the genetic diversity of RTBV from three endemic areas in Indonesia based on nucleotide and amino acid sequences of open reading frame 2 (ORF2). RTBV isolates were collected from Yogyakarta, West Nusa Tenggara, and Central Sulawesi by artificial transmission of tungro virus on TN1 seedlings using green leafhopper caught from the fields. Homology analysis of partial DNA sequences of ORF2 revealed that the three isolates had varying levels of nucleotide and amino acid sequences as high as 94–98% and 97–100%, respectively. The three isolates were genetically distant to isolates from other countries with genetic similarity levels of 77–95% based on the nucleotide sequences and 82–98% based on the amino acid sequences. The observed genetic variation among RTBV isolates indicated that various strategies of using resistant varieties should be implemented to maintain rice resistance durability.

Keywords: Rice, tungro, RTBV, genetic diversity, ORF2.

ABSTRAK

Tungro merupakan salah satu penyakit penting pada padi yang menjadi kendala dalam peningkatan produksi padi di Indonesia. Penyakit ini disebabkan oleh infeksi dua virus yang berbeda secara serologis, yaitu *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) dan *Rice tungro spherical virus* (RTSV) yang hanya dapat ditularkan oleh wereng hijau, terutama *Nephotettix virescens* (Distant) secara semipersisten. Informasi keragaman genetik virus tungro diperlukan sebagai pertimbangan dalam pengendalian penyakit tungro menggunakan varietas tahan. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi keragaman genetik RTBV dari tiga daerah endemis virus tungro di Indonesia berdasarkan sekuen basa nukleotida dan asam amino pada *open reading frame* 2 (ORF2). Isolat RTBV dikoleksi di Daerah Istimewa Yogyakarta, Nusa Tenggara Barat, dan Sulawesi Tengah dengan cara penularan virus tungro secara buatan pada bibit padi varietas TN1 menggunakan wereng hijau hasil tangkapan dari lapangan. Analisis homologi sebagian sekuen DNA ORF2 RTBV menunjukkan bahwa ketiga isolat memiliki variasi kesamaan basa nukleotida dan asam amino, berturut-turut 94–98% dan 97–100%. Ketiga isolat berbeda jauh dengan isolat dari negara lain dengan tingkat kesamaan genetik 77–95% berdasarkan sekuen RTBV nukleotida dan 82–98% berdasarkan sekuen asam amino. Keragaman dan hubungan kekerabatan genetik ketiga isolat RTBV tidak berkorelasi dengan perbedaan geografis asal isolat. Adanya keragaman genetik antarisolat RTBV mengindikasikan bahwa berbagai strategi penggunaan varietas tahan perlu dilaksanakan untuk menjaga durabilitas ketahanan padi.

Kata kunci: Padi, tungro, RTBV, keragaman genetik, ORF2.

PENDAHULUAN

Tungro merupakan salah satu penyakit penting padi yang menjadi masalah dalam peningkatan produksi padi nasional. Tungro disebabkan oleh infeksi dua virus yang berbeda, yaitu *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) dan *Rice tungro spherical virus* (RTSV) yang hanya dapat ditularkan oleh wereng hijau (vektor), terutama *Nephotettix virescens* (Distant) secara semipersisten. Dalam penularan virus tungro, RTBV merupakan virus *dependent*, sedangkan RTSV sebagai virus pembantu (*helper virus*). RTBV merupakan virus yang berperan dalam kemunculan gejala, sedangkan RTSV berperan dalam penularan (Dahal et al. 1990). Apabila tanaman hanya terinfeksi RTBV, gejala yang ditimbulkan lebih ringan berupa daun yang berwarna kuning, sedangkan apabila hanya terinfeksi RTSV tanaman tidak menunjukkan gejala penyakit (Cabauatan dan Hibino 1988).

Di Indonesia, luas serangan penyakit tungro meningkat dari tahun ke tahun. Dalam kurun waktu tahun 2001–2006, rerata luas serangan tungro mencapai 3.650 ha per tahun, kemudian pada musim tanam (MT) 2010/2011 terjadi serangan seluas 5.828 ha yang meningkat menjadi 7.177 ha pada MT 2011 (Kusprayogie 2011). Rerata luas serangan pada MT 2009/2010–2014 mencapai 4.418 ha yang tersebar di 33 provinsi (Gabriel et al. 2015). Penyebaran tungro tidak hanya terjadi di Indonesia, tetapi juga di India (Muralidharan et al. 2003), Malaysia, Filipina (Cabunagan 2003), Thailand (Tangkananond et al. 2005), dan Vietnam (Pham et al. 2007).

Tiga komponen utama dalam pengendalian penyakit tungro adalah (1) penggunaan varietas tahan dan tanam serempak, (2) eradikasi sumber inokulum, dan (3) pemilihan varietas dan pengaturan waktu tanam yang tepat, dipadukan dengan pengelolaan lingkungan dan penggunaan insektisida (Savary et al. 2012). Penggunaan varietas tahan virus tungro dan wereng hijau sesuai untuk berbagai ekosistem karena ramah lingkungan dan tidak memerlukan biaya tambahan sehingga mudah diterima oleh petani (Khoury dan Makkouk 2010). Namun, keseragaman varietas tahan di suatu wilayah akan mempermudah wereng hijau untuk beradaptasi dan mempercepat terjadinya mutasi virus tungro sehingga ketahanan varietas tidak dapat berlangsung lama. Untuk menjaga durabilitas ketahanan, diperlukan beberapa varietas tahan dengan latar belakang genetik yang berbeda (Azzam dan Chancellor 2002) atau varietas tahan spesifik lokasi untuk mengatasi strain virus tungro yang berbeda secara genetik di daerah tertentu (Choi et al. 2009).

RTBV tidak memiliki kekerabatan serologis dengan RTSV dan keduanya dapat menginfeksi satu sel tanaman secara bersama-sama tanpa mengakibatkan proteksi silang antara keduanya (Hasanuddin 2015). Ekspresi *open reading frame 2* (ORF2) pada RTBV berperan dalam pengikatan asam nukleat. Viabilitas RTBV berkorelasi dengan kemampuan ORF2 untuk berinteraksi dengan *coat protein* (CP) dan diduga ORF2 berperan dalam proses kapsidasi (*capsidation*) (Herzog et al. 2000). Diduga, terdapat variasi genetik sekuen ORF2 RTBV yang dapat berpengaruh terhadap interaksinya dengan RTSV dan vektor dalam penularan dan infeksi pada tanaman.

Analisis homologi ORF terhadap beberapa isolat RTBV dari daerah endemis di India menunjukkan adanya keragaman genetik antarisolat (Banerjee et al. 2012; Mangrauthia et al. 2012). Isolat RTBV di India tergabung dalam satu kelompok dengan isolat-isolat Asia Selatan dan terpisah jauh dari isolat dari beberapa negara Asia Tenggara, seperti Thailand, Malaysia, dan Filipina (Banerjee et al. 2011; Sharma et al. 2011).

Informasi keragaman genetik virus tungro dari daerah endemis utama di Indonesia sangat diperlukan sebagai pertimbangan dalam pengendalian penyakit tungro menggunakan varietas tahan, baik melalui perakitan dan perbaikan varietas tahan spesifik isolat virus tungro maupun pergiliran varietas tahan. Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi keragaman genetik RTBV dari tiga daerah endemis virus tungro di Indonesia berdasarkan sekuen basa nukleotida dan asam amino pada ORF2.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan dari bulan April 2009 sampai dengan Oktober 2010 di Rumah Kaca Loka Penelitian Penyakit Tungro, Sulawesi Selatan dan Laboratorium Virologi, Laboratorium Bioteknologi, dan Laboratorium Genetika di Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Koleksi Isolat Virus Tungro

Isolat virus tungro dikoleksi dari Sleman (Daerah Istimewa Yogyakarta), Lombok Tengah (Nusa Tenggara Barat), dan Donggala (Sulawesi Tengah). Benih varietas TN1 (rentan terhadap virus tungro dan wereng hijau) disemai di dalam pot, kemudian dimasukkan ke dalam kurungan kasa dan dipelihara di rumah kaca. Setelah berumur 10 hari, bibit dimasukkan ke dalam tabung gelas yang telah diisi air setinggi 1 cm. Sepuluh tabung masing-masing berisi satu bibit dibawa ke setiap daerah endemis untuk diinokulasi

dengan virus tungro menggunakan wereng hijau hasil tangkapan di lapangan menggunakan metode tabung (*test tube method*). Wereng hijau hasil tangkapan dari pertanaman yang terserang dimasukkan satu per satu ke dalam kurungan yang sebelumnya telah diisi dengan rumpun tanaman bergejala tungro dari lapangan. Setelah 5 jam, 2 ekor imago wereng hijau diinfestasikan pada tiap bibit TN1 di dalam tabung gelas. Setelah 24 jam penularan, bibit ditanam di dalam pot kemudian dimasukkan ke dalam kurungan kasa dan dipelihara di dalam rumah kaca hingga muncul gejala tungro. Sepuluh bibit yang tidak diinokulasi dan ditanam di dalam pot, kemudian dimasukkan ke dalam kurungan kasa di rumah kaca dan digunakan sebagai pembanding.

Analisis PCR dan Sekuen DNA Isolat RTBV

Tiga minggu setelah inokulasi, daun ketiga dari semua tanaman bergejala tungro hasil penularan diambil dan sebanyak 0,1 g daun digunakan untuk ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan bufer *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) mengikuti prosedur Padmalatha dan Prasad (2006) yang dimodifikasi, yaitu volume bufer CTAB dikurangi menjadi 800 μ l dan tanpa penggunaan RNase. Keberadaan RTBV pada tanaman hasil penularan dideteksi dengan PCR menggunakan pasangan primer F: 5'-GCAGAACAGAACTCTAAGGC-3' dan R: 5'-GTCTAAGGCTCATGCTGGAT-3' yang mengamplifikasi sekuen ORF2 dengan target ukuran sekitar 430 bp. PCR dilakukan dalam volume 19 μ l dengan komposisi 16 μ l *MegaMix Blue* (Clent Life Science), 1 μ l primer masing-masing dengan konsentrasi 10 pmol, dan 1 μ l DNA. Program PCR terdiri atas satu siklus pradenaturasi pada 94°C selama 5 menit, 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada 94°C selama 50 detik, penempelan primer (*annealing*) pada 55°C selama 1 menit, dan ekstensi pada 72°C selama 1 menit, serta satu siklus akhir pada 72°C selama 5 menit, kemudian proses dihentikan pada suhu 4°C.

Sebanyak 5 μ l DNA hasil PCR ditambah dengan 2 μ l *DNA Loading Dye* 1 \times (Fermentas), kemudian dielektroforesis pada *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) bersama *DNA Ladder* 1 kb di dalam bufer TBE

1 \times . Elektroforesis dilakukan selama 1 jam 30 menit pada tegangan konstan 75 V dan arus 25 mA. Hasil elektroforesis diwarnai dengan EtBr 0,1% selama 5–10 menit dan dicuci dengan akuades di atas *shaker* selama 30 menit, kemudian divisualisasi pada *UV transilluminator*.

Purifikasi DNA RTBV dilakukan dengan menggunakan reagen *ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup* (USB), yaitu 3 μ l ampikon PCR ditambah dengan 0,5 μ l *ExoSAP-IT®* di dalam tabung mikro 0,2 ml, kemudian diinkubasi pada mesin PCR pada 37°C selama 1 jam, 80°C selama 15 menit, kemudian 4°C. DNA hasil purifikasi disekuen satu arah menggunakan primer F di Laboratorium Terpadu Universitas Islam Negeri (UIN) Sunan Kalijaga, Yogyakarta.

Analisis Keragaman Genetik Isolat RTBV

Data sekuen DNA RTBV diedit dan diolah menggunakan perangkat lunak (*software*) *ChromasPro*, *Genetyx* 7.0, dan *BioEdit*. Data sekuen selanjutnya dianalisis homologinya dengan menggunakan program BLAST 2.2.24 dan *ClustalW* 1.83 yang tersedia di situs *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>). Kekerabatan antarisolat ditampilkan dalam bentuk dendrogram.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Koleksi Isolat Virus Tungro

Gejala serangan yang ditimbulkan oleh isolat virus tungro dari ketiga daerah bervariasi dari warna daun yang hijau kekuningan hingga kuning dan tanaman agak kerdil hingga kerdil (Tabel 1). Tanaman kontrol tidak memperlihatkan kedua gejala tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa wereng hijau hasil tangkapan di pertanaman berhasil memperoleh RTBV dan RTSV dan menularkannya ke tanaman TN1. Wereng hijau dapat memperoleh dan menularkan kedua virus tungro secara bersama-sama atau RTSV saja dan tidak dapat memperoleh dan menularkan RTBV jika tidak memperoleh RTSV sebelumnya (Choi et al. 2009). Rerata insidensi tungro hasil penularan dari setiap isolat virus tungro sebesar 70–100% dengan indeks penyakit antara 6–8% (Tabel 1).

Tabel 1. Insidensi dan variasi gejala tungro pada tanaman TN1 setelah diinokulasi dengan isolat virus tungro dari tiga daerah endemis di Indonesia.

Isolat	Insidensi tungro (%)	Indeks penyakit	Gejala
DIY	70,3	6,4	Hijau kekuningan dan agak kerdil
NTB	90,3	6,9	Hijau kekuningan dan agak kerdil
ST	100,0	7,9	Kuning dan kerdil
Kontrol (tanaman sehat)	0,0	1,0	Hijau dan tidak kerdil

DIY = isolat dari Daerah Istimewa Yogyakarta, NTB = isolat dari Nusa Tenggara Barat, ST = isolat dari Sulawesi Tengah.

Keberadaan RTBV pada tanaman bergejala tungro hasil penularan terdeteksi melalui analisis PCR yang ditunjukkan oleh adanya satu pita DNA dengan ukuran sekitar 430 bp pada semua sampel (Gambar 1). Berdasarkan sekuen lengkap RTBV nomor aksesori M65026 di situs DDBJ, target amplifikasi primer RTBV adalah sekuen basa nukleotida antara 576–1006 yang merupakan bagian dari ORF2.

Analisis sekuen DNA mendapatkan 360–380 basa nukleotida pada ketiga isolat RTBV. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa sekuen-sekuen tersebut merupakan bagian dari sekuen RTBV. Setelah dikoreksi, dihasilkan 222 basa nukleotida dan 74 asam amino. Berdasarkan analisis BLAST, sekuen terkoreksi tersebut sesuai dengan bagian dari sekuen ORF2 pada sekuen utuh sejumlah isolat RTBV yang telah teridentifikasi secara lengkap di DDBJ.

Perbandingan sekuen DNA ketiga isolat RTBV dengan sekuen isolat dan strain dari Filipina, Malaysia, Thailand, dan India menunjukkan adanya variasi basa nukleotida pada 67 posisi (Gambar 2). Variasi tersebut sebagian besar disebabkan oleh terjadinya substitusi basa nukleotida dari T→C, C→T, G→A, dan A→G.

Analisis PCR dan Sekuen DNA Isolat RTBV

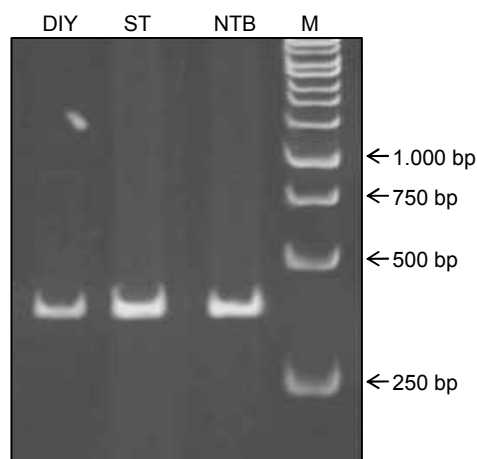
Variasi sekuen basa nukleotida menentukan jenis asam amino yang terbentuk. Variasi asam amino pada ketiga isolat dan isolat dan strain dari luar negeri ditunjukkan pada Gambar 3. Hasil tersebut menunjukkan tidak semua substitusi basa nukleotida pada kodon tertentu menyebabkan perbedaan asam amino, misalnya substitusi basa nukleotida yang terjadi pada RTBV isolat DIY dan NTB tidak membeda-

kan asam amino yang terbentuk. Sementara itu, substitusi empat basa nukleotida pada isolat ST menyebabkan perbedaan dua asam amino yang membedakannya dengan isolat DIY dan NTB. Asam amino yang berbeda pada ketiga isolat tersebut terdapat dan terletak pada urutan yang sama dengan empat strain dari Filipina yang tidak dimiliki oleh isolat Serdang, Thailand, dan India. Umumnya, keragaman genetik virus terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi, atau migrasi gen. Perubahan sekuen basa nukleotida dapat menyebabkan perubahan protein yang diekspresi sehingga berpengaruh terhadap perubahan patogenisitas dan virulensi (García-Arenal et al. 2003).

Analisis Keragaman Genetik Isolat RTBV

Adanya variasi basa nukleotida penyusun sekuen DNA dan asam amino yang terbentuk menghasilkan keragaman genetik isolat RTBV. Hasil analisis homologi menunjukkan bahwa persentase kesamaan basa nukleotida dan asam amino antara RTBV isolat DIY dan NTB berturut-turut sebesar 98% dan 100% yang lebih tinggi dibanding dengan isolat ST (Tabel 2). Apabila ketiganya dibandingkan dengan isolat dan strain RTBV dari luar negeri, persentase kesamaan basa nukleotida dan asam amino berturut-turut sebesar 77–95% dan 82–98%.

Variasi basa nukleotida pada sekuen ORF2 juga terjadi pada enam strain RTBV dari Filipina, yaitu: Phi-1, Phi-2, Phi-3, G1, G2, dan Ic yang dibandingkan dengan strain Serdang dari Malaysia (Cabauatan et al. 1999). Analisis sekuen *intergenic region* (IR) dan sebagian sekuen ORF1 pada beberapa isolat RTBV yang berasal dari Indonesia (Subang), Malaysia (Serdang), Filipina, dan Vietnam menunjukkan adanya sejumlah variasi basa nukleotida (Azzam et al. 2000). Substitusi basa nukleotida juga terjadi pada sebagian sekuen ORF4 pada beberapa isolat RTBV dari wilayah yang sama di Filipina (Villegas et al. 1997). Perbedaan yang signifikan antara isolat RTBV dari *Indian subcontinent* dan Asia Tenggara adalah terjadinya delesi sebesar 64 bp pada sekuen ORF4 isolat Asia Tenggara (Fan et al. 1996). Substitusi sejumlah basa nukleotida pada bagian ujung C-terminal *ribonuclease H* menyebabkan perubahan dua jenis asam amino yang membedakan antara RTBV isolat West Bengal dan Andhra Pradesh (Nath et al. 2002). Substitusi basa nukleotida yang terjadi pada ORF2 RTBV isolat West Bengal, Andhra Pradesh, dan Kanyakumari tidak menyebabkan perubahan asam amino sehingga kesamaan sekuen asam amino dari ketiganya sebesar 100% (Sharma et al. 2011). Keragaman genetik dan virulensi virus tungro di Asia Tenggara berbeda dengan virus tungro di Asia Selatan (Azzam dan Chancellor 2002).



Gambar 1. Pita DNA RTBV berukuran 430 bp hasil analisis PCR dengan primer spesifik RTBV. DIY = isolat dari Daerah Istimewa Yogyakarta, ST = isolat dari Sulawesi Tengah, NTB = isolat dari Nusa Tenggara Barat, M = *marker*.

```

Chainat      *****C*****T*****C*****
TB           *****A**CC*G*****C*****
DIY          *****G*****
NTB          *****G*****
Filipina     *****GA*****
G2           *****GA*****
ST           *****TT*****
Serdang      *****T*****G*****
G1           *****A*****TT*****
Ic           *****T*****A*****TT*****
Kanyakumari *****C**T*****T*A*****A*****GG*TT**G**T*A*****AAAC*****
WB           *****C**T*****T*A*****A*****GG*TT**G**T*A*****AAAC*****

Chainat      *****CT*****
TB           **A*****CT*****T*****
DIY          *****G*****C*****
NTB          *****G*****C*****
Filipina     *****GT**G**C**G*****T*****
G2           *****GT**G**C**G*****T*****
ST           *****G**C**G*****CT*****
Serdang      *****A*****
G1           *****T*****C*****
Ic           *****T*****C*****
Kanyakumari *****GGC*****T*****TC**GGG*****A*****
WB           *****GGC*****T*****TC**GGG*****A*****

Chainat      *****G**A*****
TB           *****G**A*****
DIY          *****A*****C*****
NTB          *****A*****CC*****
Filipina     *****G*****T*****
G2           *****G*****T*****
ST           *****A*****C*****
Serdang      *****A*****CAGATG**T**TT
G1           *****A*****CC*****
Ic           *****A*****CC*****
Kanyakumari *****AC*****C*****G**A*****T*A
WB           *****AC*****C*****G**A*****T*A

Chainat      *****T*****
TB           *****T*****C*****G**
DIY          *****
NTB          *****A*****
Filipina     ***A*****
G2           ***A*****
ST           *****A*****
Serdang      ***A*****
G1           *****A*****
Ic           *****A*****
Kanyakumari T**T**A*****G**AA*****T**C**
WB           T**T**A*****G**AA*****T**C**

```

Gambar 2. Homologi sekuen basa nukleotida pada sebagian ORF2 tiga isolat RTBV dari Indonesia dan beberapa isolat dan strain dari luar negeri hasil analisis *multiple sequence alignment* dengan program *ClustalW* 1.83. * = basa nukleotida sama pada semua isolat, Chainat = Thailand (AF220561), TB = Thailand (AF094569), DIY = isolat dari Daerah Istimewa Yogyakarta, NTB = isolat dari Nusa Tenggara Barat, Filipina = Filipina (X57924), G2 = Filipina (AF113831), ST = isolat dari Sulawesi Tengah, Serdang = Malaysia (AF076470), G1 = Filipina (AF113830), Ic = Filipina (AF113832), KK = Kanyakumari, India (HQ385226), WB = West Bengal, India (AJ314596).

Dendrogram hubungan kekerabatan genetik antarisolat RTBV berdasarkan variasi basa nukleotida penyusun sekuen DNA ORF2 menunjukkan bahwa isolat DIY, NTB, dan ST berkerabat dekat dan tidak berkorelasi dengan perbedaan geografis asal isolat. Ketiganya tergabung dalam satu kelompok bersama isolat Filipina dan strain G2 (Gambar 4). Kelompok tersebut terpisah dari strain Serdang dan kelompok lain yang terdiri atas isolat dari Thailand, India, dan dua strain dari Filipina. Posisi strain Serdang yang ter-

pisah dari kelompok isolat dan strain yang lain sejalan dengan hasil penelitian Cabauatan et al. (1999).

Hasil pengelompokan berdasarkan sekuen sebagian ORF2 tersebut berbeda dengan dendrogram kekerabatan isolat RTBV berdasarkan variasi sekuen DNA utuh, yaitu isolat West Bengal, Kanyakumari, Andhra Pradesh, dan Chinsura mengelompok terpisah jauh dari beberapa isolat dan strain dari Thailand, Malaysia, dan Filipina (Sharma et al. 2011). Analisis kekerabatan berdasarkan sekuen IR dan sebagian ORF1 juga menunjukkan bahwa dua isolat

```

G1          *****VS*****
Ic          *****S*****
Chainat     *****A*****
TB          ****S***Q*****A*****
Serdang     *****A*****I*****TDDI*
Filipina    *****G*****SA*****
G2          *****G*****SA*****
ST          *****S*****A*****
DIY         *****G*****
NTB         *****G*****
Kanyakumari *****D***E**N***G***QG*****
WB          *****D***E**N***G***QG*****

G1          *****
Ic          *****
Chainat     *****
TB          *****G
Serdang     *T*****I*
Filipina    *T*****
G2          *T*****
ST          *****
DIY         *****
NTB         *****
Kanyakumari S**G*I*****
WB          S**G*I*****

```

Gambar 3. Homologi asam amino pada sebagian ORF2 tiga isolat RTBV dari Indonesia dan beberapa isolat dan strain dari luar negeri hasil analisis *multiple sequence alignment* dengan program *ClustalW* 1.83. * = basa nukleotida sama pada semua isolat. Keterangan isolat dan strain beserta nomor aksesinya tercantum pada Gambar 2.

Tabel 2. Persentase kesamaan basa nukleotida dan asam amino pada sebagian ORF2 tiga isolat RTBV dari Indonesia dan beberapa isolat dan strain dari luar negeri¹.

	DIY	NTB	ST	Serdang	Filipina	G1	G2	Ic	KK	WB	TB	Chainat
DIY	*											
NTB	98 (100)	*										
ST	94 (97)	95 (97)	*									
Serdang	95 (89)	94 (89)	92 (87)	*								
Filipina	94 (95)	92 (95)	93 (95)	92 (87)	*							
G1	93 (97)	93 (97)	92 (97)	91 (87)	90 (93)	*						
G2	94 (95)	92 (95)	93 (95)	92 (87)	100 (100)	90 (93)	*					
Ic	94 (98)	94 (98)	92 (98)	91 (89)	90 (94)	99 (98)	92 (94)	*				
KK	78 (87)	78 (87)	77 (86)	79 (78)	84 (83)	86 (86)	84 (83)	86 (87)	*			
WB	80 (87)	78 (87)	78 (86)	79 (78)	84 (83)	86 (86)	84 (83)	86 (87)	87 (100)	*		
TB	91 (94)	90 (94)	89 (93)	89 (86)	90 (90)	91 (93)	90 (90)	92 (94)	78 (83)	78 (83)	*	
Chainat	92 (98)	93 (98)	88 (97)	92 (90)	92 (94)	93 (97)	92 (94)	94 (98)	82 (87)	81 (87)	96 (96)	*

¹Keterangan isolat dan strain beserta nomor aksesinya tercantum pada Gambar 2.

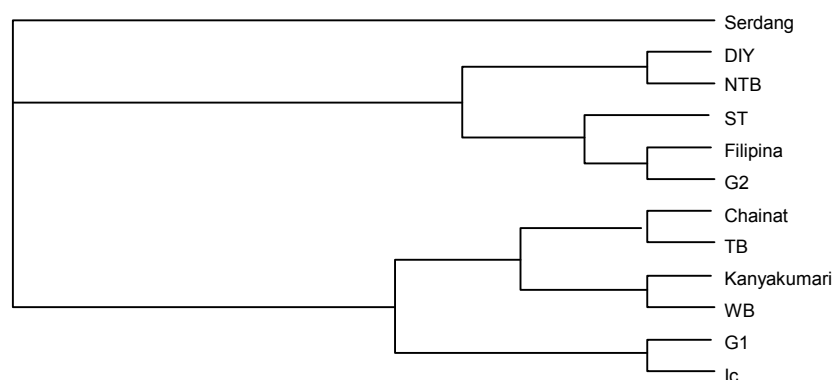
²Data di dalam tanda kurung merupakan persentase kesamaan asam amino.

RTBV dari Indonesia terpisah dari isolat Malaysia, Filipina, dan Vietnam (Azzam et al. 2000). Hal tersebut menunjukkan bahwa variasi basa nukleotida pada bagian tertentu pada sekuen utuh DNA RTBV mempunyai tingkat kesamaan yang beragam antarisolat dan strain yang berbeda.

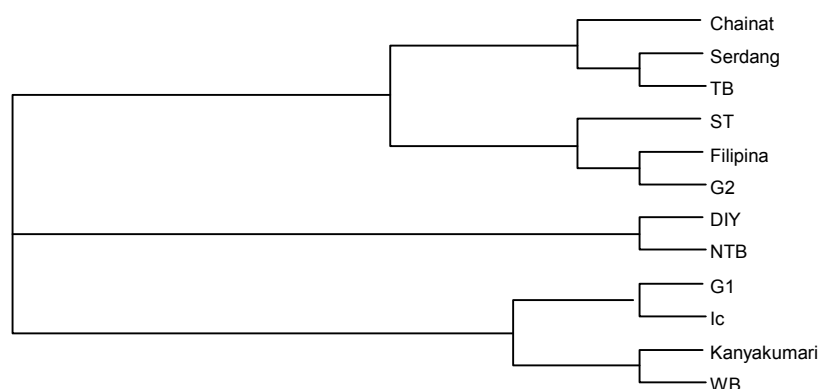
Kekerabatan genetik antarisolat RTBV berdasarkan asam amino sebagian sekuen ORF2 terlihat berbeda dengan kekerabatan berdasarkan sekuen basa nukleotidanya (Gambar 5). Isolat DIY dan NTB menjadi kelompok terpisah dari dua kelompok yang lain, sedangkan isolat ST masih tergabung dalam satu kelompok dengan isolat Filipina dan strain G2. Perubahan posisi juga terjadi pada isolat dari Thailand yang terpisah jauh dari kelompok India dan tergabung

dalam kelompok Serdang. Posisi isolat dan strain dari Filipina serta isolat dari India terlihat lebih konsisten. Kesamaan basa nukleotida dan asam amino pada sekuen utuh ORF2 antara isolat Phil 1 dan West Bengal masing-masing sebesar 81,7% dan 87,3% sehingga keduanya berkerabat agak jauh dalam kekerabatan genetik (Nath et al. 2002).

Keragaman molekuler antarisolat RTBV dari ketiga daerah endemis ditunjukkan oleh adanya variasi basa nukleotida penyusun sekuen DNA dan asam amino yang terbentuk. Isolat ST mempunyai asam dua asam amino yang berbeda dengan isolat DIY dan NTB. Adanya sejumlah asam amino yang berbeda antarisolat RTBV akan menghasilkan perbedaan ekspresi protein yang dapat berpengaruh dalam pe-



Gambar 4. Dendrogram kekerabatan genetik beberapa isolat dan strain RTBV berdasarkan perbedaan sekuen basa nukleotida pada sebagian ORF2. Keterangan isolat dan strain beserta nomor aksesinya tercantum pada Gambar 2.



Gambar 5. Dendrogram kekerabatan genetik beberapa isolat dan strain RTBV berdasarkan variasi asam amino pada sebagian ORF2. Keterangan isolat dan strain beserta nomor aksesinya tercantum pada Gambar 2.

nularan dan infeksi dan terekspresi sebagai gejala penyakit yang bervariasi (Tabel 1).

Keragaman dan kekerabatan genetik isolat RTBV dan RTSV di berbagai daerah endemis merupakan informasi yang sangat penting untuk menentukan strategi pengendalian menggunakan varietas tahan, di antaranya melalui perakitan dan perbaikan varietas tahan spesifik isolat virus tungro, pergiliran varietas tahan, dan penanaman multivarietas dengan gen ketahanan berbeda (Sharma et al. 2011; Skelsey et al. 2005). Beberapa varietas tahan tungro spesifik isolat telah dihasilkan dari perakitan dan perbaikan varietas menggunakan materi tetua tahan yang sesuai untuk menghadapi isolat virus tungro tertentu dari daerah endemis (Praptana dan Muliadi 2015). Varietas tahan tungro dengan kandungan berbagai gen ketahanan ini dapat digunakan dalam program pergiliran varietas untuk pengendalian tungro dan menjaga durabilitas ketahanan terhadap virus dan wereng hijau. Namun, durabilitas ketahanan dapat menurun karena tekanan seleksi dapat meningkatkan virulensi sehingga perlu pemantauan virulensi patogen terhadap setiap varietas tahan di suatu wilayah endemis secara temporal (Fabre et al. 2012; Janzac et al. 2009).

KESIMPULAN

Analisis homologi sekuen DNA menunjukkan adanya kesamaan basa nukleotida dan asam amino pada ketiga isolat, berturut-turut sebesar 94–98% dan 97–100%. Dibanding dengan isolat dari negara lain, ketiga isolat memiliki kesamaan genetik sebesar 77–95% berdasarkan sekuen basa nukleotida dan 82–98% berdasarkan asam amino. Keragaman dan hubungan kekerabatan genetik ketiga isolat RTBV tidak berkorelasi dengan perbedaan geografis asal isolat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian yang telah membiayai penelitian ini melalui Program Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T). Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Arvan (Unisa, Palu) dan Abdul Gaffar (BPTP NTB) atas bantuannya dalam survei dan pelaksanaan teknis di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Azzam, O., Arboleda, M., Umadhay, K.M.L., de los Reyes, J.B., Cruz, F.S., Mackenzie, A. & McNally, K.L. (2000) Genetic composition and complexity of virus populations at tungro-endemic and outbreak rice sites. *Archives of Virology*, 145, 2643–2657.
- Azzam, O. & Chancellor, T.C.B. (2002) The biology, epidemiology, and management of rice tungro disease in Asia. *Plant Disease*, 86, 88–100.
- Banerjee, A., Roy, S. & Tarafdar, J. (2011) Phylogenetic analysis of *Rice tungro bacilliform virus* ORFs revealed strong correlation between evolution and geographical distribution. *Virus Genes*, 43 (3), 398–408.
- Banerjee, A., Roy, S. & Tarafdar, J. (2012) The large intergenic region of *Rice tungro bacilliform virus* evolved differentially among geographically distinguished isolates. *Virus Genes*, 44 (2), 312–318.
- Cabauatan, P.Q. & Hibino, H. (1988) Isolation, purification, and serology of *Rice tungro bacilliform* and *Rice tungro spherical viruses*. *Plant Disease*, 72, 526–528.
- Cabauatan, P.Q., Melcher, U., Ishikawa, K., Omura, T., Hibino, H., Koganezawa, H. & Azzam, O. (1999) Sequence changes in six variants of *Rice tungro bacilliform virus* and their phylogenetic relationships. *Journal of General Virology*, 80, 2229–2237.
- Cabunagan, R.C., Sandig, E., Pamplona, A. & Choi, R. (2003) Use of resistant varieties in the management of rice tungro disease in Iloilo (Philippines). *Tropical Plant Pathology*, 39 (1 & 2), 78–79.
- Choi, I.R., Cabauatan, P.Q. & Cabunagan, R.C. (2009) Rice tungro disease. *Rice Fact Sheet, IRRI, Sep. 2009*, 1–4.
- Dahal, G., Hibino, H. & Saxena, R.C. (1990) Association of leafhopper feeding behavior with transmission of rice tungro to susceptible and resistant rice cultivar. *Phytopathology*, 80, 659–665.
- Du, P.V., Cabunagan, R.C., Cabauatan, P.Q., Choi, H.S., Choi, I.R. Chien, H.V. & Huan, N.H. (2007) Yellowing syndrome of rice etiology, current status, and future challenges. *Omonrice*, 15, 94–101.
- Fabre, F., Rousseau, E., Mailleret, L. & Moury, B. (2012) Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes. *New Phytologist*, 193 (4), 1064–1075.
- Fan, Z., Dahal, G., Dasgupta, I., Hay, J. & Hull, R. (1996) Variation in the genome of *Rice tungro bacilliform virus*: Molecular characterization of six isolates. *Journal of General Virology*, 77, 847–854.
- Gabriel, D.R., Ashar, B.L. & Darmadi, D. (2015) Prakiraan serangan OPT utama padi pada MT 2015. *Majalah Peramalan OPT 14/1/Mei/2015*.
- García-Arenal, F., Fraile, A. & Malpica, J.M. (2003) Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology*, 6, 225–232.
- Hasanuddin, A. (2008) Perbaikan ketahanan varietas padi terhadap penyakit tungro. *Iptek Tanaman Pangan*, 3 (2), 215–228.
- Herzog, E., Guerra-Peraza, O. & Hohn, T. 2000. The *Rice tungro bacilliform virus* gene II product interacts with the coat protein domain of the viral gene III polyprotein. *Journal of Virology*, 74 (5), 2073–2083.
- Janzac, B., Fabre, F., Palloix, A. & Moury, B. (2009) Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Molecular Plant Pathology*, 10 (5), 599–610.
- Khoury, W.E. & Makkouk, K. (2010) Integrated plant disease management in developing countries. *Journal of Plant Pathology*, 92 (4), 35–42.
- Kusprayogie, Y., Nuzulullia, U. & Gabriel, D.R. (2011) Prakiraan serangan OPT utama padi pada MT 2011/2012. *Buletin Peramalan OPT, Vol.11/No.2/Edisi XIII/Okt./2011*.
- Mangrauthia, S.K., Malathi, P., Agarwal, S., Sailaja, B., Singh, J., Ramkumar, G., Krishnaveni, D. & Balachandran, S.M. (2012) The molecular diversity and evolution of *Rice tungro bacilliform virus* from Indian perspective. *Virus Genes*, 45 (1), 126–138.
- Muralidharan, K., Krishnaveni, D., Rajarajeswari, N.V.L. & Prasad, A.S.R. (2003) Tungro epidemics and yield losses in paddy fields in India. *Current Science*, 85 (8), 1143–1147.
- Nath, N., Mathur, S. & Dasgupta, I. (2002) Molecular analysis of two complete *Rice tungro bacilliform virus* genomic sequences from India. *Archives of Virology*, 147, 1173–1187.
- Padmalatha, K. & Prasad, M.N.V. (2006) Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African Journal of Biotechnology*, 5 (3), 230–234.
- Praptana, R.H. & Muliadi, A. (2013) Durabilitas ketahanan varietas padi terhadap penyakit tungro. *Iptek Tanaman Pangan*, 8 (1), 1–7.
- Savary, S., Horgan, F., Willocquet, L. & Heong, K.L. (2012) A review of principles for sustainable pest management in rice. *Crop Protection*, 32, 54–63.
- Sharma, S., Rabindran, R., Robin, S. & Dasgupta, I. (2011) Analysis of the complete DNA sequence of *Rice tungro bacilliform virus* from southern India indicates it to be a product of recombination. *Archives of Virology*, 156 (12), 2257–2262.
- Skelsey, P., Rossing, W.A.H., Kessel, G.J.T., Powell, J. & van der Werf, W. (2005) Influence of host diversity on development of epidemics: An evolution and elaboration of mixture theory. *Phytopathology*, 95, 328–338.
- Tangkananond, W., Chettanachit, D. & Boonnadee, W. (2005) Isolation and purification of *Rice tungro virus*. *Thammasat International Journal of Science and Technology*, 10 (1), 6–18.
- Villegas, L.C., Druka, A., Bajet, N.B. & Hull, R. (1997) Genetic variation of *Rice tungro bacilliform virus* in the Philippines. *Virus Genes*, 15 (3), 195–201.